

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
14. Juli 2005 (14.07.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2005/063234 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 31/366**,  
31/20, 31/137, 45/06

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/014687

(22) Internationales Anmeldedatum:  
23. Dezember 2004 (23.12.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
103 60 954.7 23. Dezember 2003 (23.12.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): **ESPARMA GMBH** [DE/DE]; Lange Göhren 3,  
39171 Osterweddingen (DE). **IMTM GMBH** [DE/DE];  
Leipziger Strasse 44, 39104 Magdeburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **ANSORGE, Siegfried**  
[DE/DE]; Am Sportplatz 1, 39291 Hohenwarthe (DE).  
**KOEGST, Dieter** [DE/DE]; Im Heidefeld 57, 39175  
Wahlitz (DE). **TÄGER, Michael** [DE/DE]; Akazien-  
strasse 29, 39326 Heinrichsberg (DE). **FRIES, Gerhard**  
[DE/DE]; Im Heidefeld 18, 39175 Wahlitz (DE).

(74) Anwalt: **PFENNING, MEINIG & PARTNER GBR**;  
Patentanwälte, Mozartstrasse 17, 80336 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,  
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,  
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,  
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,  
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,  
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,  
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-  
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: USE OF AT LEAST ONE EFFECTOR OF GLUTATHIONE METABOLISM, TOGETHER WITH ?LPHA LIPONIC  
ACID, FOR THE TREATMENT OF CHRONICALLY OBSTRUCTIVE LUNG DISEASES

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON MINDESTENS EINEM EFFEKTOR DES GLUTATHIONMETABOLISMUS  
ZUSAMMEN MIT  $\alpha$ -LIPONSÄURE ZUR BEHANDLUNG CHRONISCH OBSTRUKTIVER LUNGENERKRANKUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to the use of at least one effector of glutathione metabolism, together alpha liponic acid, the  
salts and/or prodrugs thereof for simultaneous or timed cytoprotective treatment of chronically obstructive lung diseases.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von mindestens einem Effektor des Glutathionmeta-  
bolismus zusammen mit  $\alpha$ -Liponsäure, deren Salze und/oder deren Prodrugs zur gleichzeitigen, getrennten oder zeitlich abgestuften  
zytoprotektiven Behandlung chronisch obstruktiver Lungenerkrankungen.



WO 2005/063234 A2

Verwendung von mindestens einem Effektor des Glutathionmetabolismus zusammen mit  $\alpha$ -Liponsäure zur Behandlung chronisch obstruktiver Lungenerkrankungen

5 Die Erfindung betrifft die Verwendung von mindestens einem Effektor des Glutathionmetabolismus zusammen mit  $\alpha$ -Liponsäure, deren Salze und/oder deren Prodrugs zur gleichzeitigen, getrennten oder zeitlich abgestuften zytoprotektiven Behandlung chronisch obstruktiver Lungenerkrankungen.

Chronisch obstruktive Lungenerkrankungen (chronische Bronchitis, chronic obstructive pulmonary diseases, COPD) zählen zu den zahlenmäßig am stärksten wachsenden Gesundheitsproblemen der modernen Industrienationen. Die Ursachen für diese Zunahme sind vielfältig, wobei Umweltfaktoren sowie ungünstige Lebensgewohnheiten einschließlich Nikotinabusus eine besondere Rolle spielen. Der jährlich durch direkte und indirekte Krankheitskosten entstehende volkswirtschaftliche Schaden stellt eine erhebliche Belastung dar und begründet vielfältige Maßnahmen für therapeutische

und präventive Interventionen.

Einmal manifest gewordene chronische Lungenobstruktionen sind in der Regel nicht ursächlich therapierbar. Die Behandlung muss sich an der möglichst weitgehenden Reduktion der Symptomatik orientieren. Hierzu zählen Sekretolyse sowie Bronchodilatation. Mit Ausnahme leichterer Formen ist eine begleitende entzündungshemmende Therapie mit Cortikosteroiden zwingend erforderlich.

In den vergangenen Jahren wurde eine Reihe von experimentellen Arbeiten durchgeführt, in denen versucht wurde, pathophysiologische Zusammenhänge hinsichtlich der Lungenfunktionseinschränkung und zellulären Effektormechanismen sowohl der Lungenzelltypen als auch einwandernder bzw. residenter Immunzellen nachzuvollziehen.

Im Ergebnis zeichnete sich insbesondere neben gewebedestruierenden Prozessen, welche von matrixgebundenen und löslichen Proteasen vermittelt werden und letztlich zur Entstehung des Lungenemphysems führen, eine Dysregulation der Funktion lungentypischer Immunzellen ab. Im Vordergrund stehen hier Alveolarmakrophagen, die den zahlenmäßig größten Anteil mit über 83% der Immunzellen im bronchoalveolären Raum ausmachen. Der Vergleich von Alveolarmakrophagen Gesunder mit COPD Patienten zeigt eine deutlich verringerte Funktionalität der Alveolarmakrophagen in den Patientengruppen, welche hauptsächlich durch den Verlust der originären Phagozytosefähigkeit sowie der Bakterizidie gekennzeichnet ist und regelmäßig von einer Störung in der Homöostase der Zytokinproduktion begleitet wird.

Darüberhinaus konnte nachgewiesen werden, dass Alveo-  
larmakrophagen von COPD Patienten und insbesondere  
von rauchenden COPD Patienten einen hochgradig ge-  
schädigten Thiol-Disulfidstatus aufweisen. Im Zusam-  
menhang mit den Kenntnissen hinsichtlich einer direk-  
ten Korrelation von Thioldefekt und Funktionsstörung  
in anderen zellulären Systemen war der Schluss nahe-  
liegend, dass dieses pulmonale Thioldefizit eine pa-  
thophysiologische Schlüsselrolle bei der Entstehung  
und insbesondere der Unterhaltung der Erkrankung dar-  
stellt.

Die Feinregulation des Thiol-Disulfidstatus stellt  
eine der wichtigsten Grundvoraussetzungen biologi-  
scher Stoffwechselleistungen dar. Das zentrale Regu-  
lationselement innerhalb dieses Systems ist das Tri-  
peptid Glutathion, welches intrazelluläre in redu-  
zierter Form relativ hohe Konzentrationen (bis zu 10  
mM) erreicht.

Neben dem Glutathion sind SH (Thiol)-Gruppen tragende  
Proteine intrazelluläre und insbesondere in zellmemb-  
rangebundener Form weitere bedeutende Bausteine des  
Thiol-Disulfidstatus jeder Zelle.

Der durch verschiedene Enzymklassen regulierte Meta-  
bolismus der Disulfidspaltung und Thiolgruppenbildung  
ist durch die Vielfalt seiner biologischen Funktionen  
u.a. bei zellulären Wachstums- und Differenzierungs-  
prozessen einschließlich des programmierten Zelltodes  
sowie Zellschutz- und Entgiftungsmechanismen in sei-  
ner Intaktheit unabdingbar für jede normale Zellfunk-  
tion. Störungen in diesem System und Veränderungen  
der Konzentration der Thiole führen zu schwerwiegen-  
den zellulären Funktionsstörungen, die nur im Einzel-  
fall lokal begrenzt bleiben, in der Regel jedoch den

gesamten Organismus beeinträchtigen.

5 So ist aus der DE 101 25 883 bekannt, dass insbesondere unter den Bedingungen einer hochgradig eingeschränkten Nierenfunktion und dadurch erforderlicher Nierenersatztherapie in Form der Hämo- bzw. Peritonealdialyse der zelluläre Thiol-Disulfidstoffwechsel schwer gestört ist. Diese Störung hat u.a. einen weitgehenden Verlust normaler Zellfunktionen, die der Phagozytosefähigkeit von Peritonealmakrophagen oder 10 der Aktivierbarkeit von Lymphozyten, zur Folge.

15 Die DE 101 25 832 beschreibt Studien im Rahmen von Diabetes mellitus, bei denen eine Verschiebung des Redoxzustands zu Lasen reduzierten Glutathions als auch eine absolute Verringerung des Gesamtpools an Glutathion nachgewiesen werden konnte. Diese Störung kann durch eine Kombination von  $\alpha$ -Liponsäure und Prothiolen behoben werden.

20 Ausgehend hiervon war es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Arzneimittel bereitzustellen, mit dem die Funktionalität der Alveolarmakrophagen bei chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen wiederhergestellt werden kann und die damit in Verbindung stehende Störung in der Homöostase der Zytokinproduktion behoben werden kann.

30 Diese Aufgabe wird durch die Verwendung mit den Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst. Die weiteren abhängigen Ansprüche zeigen vorteilhafte Weiterbildungen auf.

35 Erfindungsgemäß wird die Verwendung von mindestens einem Effektor des Glutathionmetabolismus zusammen mit  $\alpha$ -Liponsäure, deren Salze und/oder deren Prodrugs zur gleichzeitigen, getrennten oder zeitlich abge-

stuften zytoprotektiven Behandlung chronisch obstruktiver Lungenerkrankungen gelehrt.

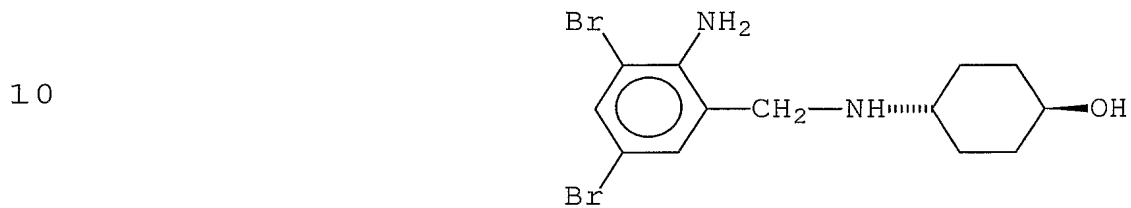
5 Es konnte gezeigt werden, dass durch die Applikation der erfindungsgemäß zur Anwendung kommenden Kombination von  $\alpha$ -Liponsäure und den Effektoren des Glutathionmetabolismus eine Normalisierung des primär verringerten Thiolstatus von Alveolarmakrophagen einsetzte. Die thiolstabilisierende Wirkung der Kombination überstieg dabei die der alleinigen Verwendung  
10 von  $\alpha$ -Liponsäure oder der jeweiligen Effektoren nicht nur regelmäßig, vielmehr konnten auch superadditive Effekte nachgewiesen werden.

15 Die Restitution des Thiolstatus erfasste dabei sowohl intrazelluläre Thiole als auch membrangebundene SH-Gruppen und ist somit Ausdruck einer komplexen biologischen Regulation. Dieses Phänomen beruht darauf, dass die Effektoren des Glutathionstoffwechsels einerseits intermediär entstehende freie Radikale eliminieren, und andererseits die Verfügbarkeit reduzierender Äquivalente für die Umwandlung der  $\alpha$ -  
20 Liponsäure aus disulfidischer in reduzierte Form erhöhen und somit die Synthese induzierende Wirkung der  $\alpha$ -Liponsäure auf den Thiol-Disulfidstatus verbessern. Die Restitution des Thiolstatus der Immunzellen wurde  
25 begleitet von einer Normalisierung der Phagozytoseaktivität als Ausdruck einer Regulation zentraler funktioneller Parameter.

30 Die erfindungsgemäß zur Anwendung kommenden Kombinationen von  $\alpha$ -Liponsäure mit einem Effektor des Glutathionmetabolismus können in den üblichen pharmakologischen Darreichungsformen oder als Instillat sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch verabreicht werden. Die effektive Dosis ist dabei fallbe-  
35

zogen zu ermitteln und liegt bevorzugt im Bereich zwischen 30 und 1800 mg/d und besonders bevorzugt zwischen 200 und 600 mg/d  $\alpha$ -Liponsäure.

5 Vorzugsweise wird als Effektor des Glutathionmetabolismus Ambroxol mit der allgemeinen Formel I



15 dessen Salze und/oder dessen Prodrugs verwendet. Die Dosis von Ambroxol, dessen Salze und/oder dessen Prodrugs für die humanmedizinische Applikation beim Patienten liegt dabei vorzugsweise im Bereich zwischen 7,5 und 90 mg/d und besonders bevorzugt zwischen 60 und 75 mg/d.

20

Ambroxol wird in verschiedenen Darreichungsformen bei Lungen- und Bronchialerkrankungen als schleimlösendes Medikament eingesetzt. Die Wirkung des Ambroxols als

25 Mukolytikum beruht sowohl auf einer Stimulation der Suffactant-Produktion der Bronchialzellen als auch insbesondere auf der Fähigkeit, freie Radikale zu eliminieren. Die hierauf basierende antioxidative Aktivität der Substanz konnte hauptsächlich an pulmonalen Zellen, aber auch im Rahmen von entzündlichen Me-

30

chanismen nachgewiesen werden.

In einer weiteren bevorzugten Variante wird als Effektor des Glutathionmetabolismus Silibinin eingesetzt. Die Dosis von Silibinin, dessen Salze und/oder dessen Prodrugs für die humanmedizinische Applikation

35

beträgt beim Patienten dabei bevorzugt zwischen 20 und 1600 mg/d und besonders bevorzugt zwischen 300 und 800 mg/d.

5. Bei Silibinin handelt es sich um einen Vertreter natürlich vorkommender Polyhydroxyphenylchromanonverbindungen, welche als Flavolignane bekannt sind. Innerhalb der Gruppe der Flavolignane Silymarin als Extrakt der Mariendistelfrüchte beschrieben. Silymarin  
10 wiederum ist ein Komplex aus den Flavonoiden Silibinen, Silichristin, Silidianin sowie Bitterstoffen. Wie in DE 35 37 656 beschrieben, kann Silibinin einschließlich der Stellungsisomere aus diesem Komplex isoliert werden.

15 Die Verabreichung des beschriebenen Arzneimittels kann innalativ, oral oder parenteral erfolgen. Das Arzneimittel kann dabei die Form eines Aerosols, z.B. als Staub-, Nebel-, Spray oder Inhalationsaerosol, einer Lösung, eines Granulats, eines Pulvers,  
20 einer Emulsion, einer Tablette und/oder einer Filmtablette besitzen.

Vorzugsweise kann das Arzneimittel weitere Additive, ausgewählt aus der Gruppe wässriger Lösungsmittel, Stabilisatoren, Suspensions-, Dispersions- und Benetzungsmittel enthalten.

30 Der Effektor des Glutathionmetabolismus und die  $\alpha$ -Liponsäure können dabei sowohl in einer einzigen Formulierung als auch in getrennten Formulierungen vorliegen.

35 Anhand der nachfolgenden Beispiele soll die erfindungsgemäße Verwendung näher erläutert werden.



## Beispiel 1

Einfluss der Kombination von  $\alpha$ -Liponsäure mit Ambroxol auf den zellulären Thiolstatus von Alveolar-  
makrophagen

Zur Verwendung kam die etablierte normale Alveolar-  
makrophagen-Zelllinie CRL 21-92 (NR8383 [AgC11x3A;  
NR8383.1]). Die Zellen wurden in speziellen Zellkultur-  
medien aufgenommen und in einem Begasungsbrut-  
schrank bei 37°C, einer relativen Luftfeuchte von 98%  
und 5% relativem Luft-CO<sub>2</sub>-Gehalt inkubiert. Um den  
Einfluss der erfindungsgemäß zur Anwendung kommenden  
Kombinationen auf den Thiolstatus thioldefizienter  
Alveolarmakrophagen zu prüfen, wurden diese artifi-  
ziell thioldepletiert. Dies erfolgte durch Kultivie-  
rung in thioldefizienten Medien (TDM) nach erprobten  
Verfahren [Free Radic Biol Med 2000; 29:1160-1165].  
Vergleichskulturen unter Verwendung von Vollmedien  
(RPMI 1640) dienten der Definition des unter Kultur-  
bedingungen bestmöglichen Normalwertes.

Die Bestimmung des interzellulären Thiolgehaltes auf  
Einzelzellebene erfolgte unter Verwendung von 5-  
Chloromethylfluoresceindiacetat (CMFDA) in der Durch-  
flußzytofluorimetrie [Cytometry 1994; 15:349-358, Cy-  
tometry 1997; 29:76-82].

Primär nicht fluorogenes CMFDA wird dabei passiv von  
der Zelle aufgenommen. Über den Chlormethylrest er-  
folgt eine Bindung an zytoplasmatische Thiolgruppen.  
Nach Abspaltung der Acetatreste durch unspezifische  
zelluläre Esterasen wird dieser, nun zellmembran-  
impermeable Komplex bei einer Exitationswellenlänge  
 $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$  mit einer Emissionswellenlänge  $\lambda_{\text{em}} = 520$   
nm fluorogen. Die mittlere Fluoreszenzintensität der

Probe (10.000 Zellen) ist der Konzentration der intrazellulären Thiolgruppen direkt proportional.

Die Expression membrangebundener Thiolgruppen wurde ebenfalls durchflußzytofluorimetrisch ermittelt. Hierbei wurde Chloromethyltetramethylrhodamin (CMTMR) unter den Bedingungen eines blockierten Membranpotentials sowie einer gehemmten Diffusionskapazität der Zellen als Thiolkonjugat eingesetzt [Exp Hematol 1997; 25(7): 601-607]. Die Fluoreszenzintensität der gebunden Fluorochrommoleküle an der Zellmembran ist dabei wiederum proportional der Menge der Thiolgruppen an der Zelloberfläche. Immortalisierte Alveolarmakrophagen wurden in der oben beschriebenen Versuchsanordnung artifiziell thioldepletiert. Der Einfluss der erfindungsgemäß zur Anwendung kommenden Substanzen wurde über einen Zeitraum von 96 Stunden mittels Messung des intrazellulären Thiolgehaltes sowie der Membranexpression von Thiolen überprüft.

Es zeigte sich, dass beginnend nach 24 Stunden die Kombination von  $\alpha$ -Liponsäure und Ambroxol in einem breiten Konzentrationsbereich von 100 nM bis 10  $\mu$ M eine vollständige Restitution des Thiolstatus der Alveolarmakrophagen initiierte. Wie in Tabelle 1 dargestellt, wurden signifikante Steigerungen des Thiolgehaltes über den gesamten Untersuchungszeitraum für diese Ambroxoldosen nachgewiesen. Die alleinige Wirkung der  $\alpha$ -Liponsäure wurde regelmäßig signifikant überschritten.

Tabelle 1 zeigt den Einfluss von  $\alpha$ -Liponsäure in Kombination mit Ambroxol auf die intrazelluläre Thiolkonzentration einer Alveolarmakrophagen-Zelllinie [\* :  $p < 0,05$ , ANOVA,  $n=12$ ].

Tabelle 1:

Thiole, intra- zellulär (CMFDA) [%]	24h			48h			72h			96h		
	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD
KO, normal RPMI1640	100,0	±	38,0	100,0	±	67,9	100,0	±	24,2	100,0	±	5,4
KO, thioldefi- zient TDM	65,0	±	6,0	35,7	±	13,3	59,6	±	16,8	73,3	±	12,4
αLS[10,0 µg/ml] TDM	70,2	±	8,4	58,9	±	10,4	78,1	±	30,0	72,5	±	19,1
αLS[10,0 µg/ml] Ambroxol [0,1 µM] TDM	93,6	±	17,8*	96,9	±	63,6*	117,8	±	12,5*	102,7	±	27,7*
αLS[10,0 µg/ml] Ambroxol [1,0 µM] TDM	91,7	±	8,6*	77,5	±	32,0*	101,5	±	26,8*	101,1	±	8,3*
αLS[10,0 µg/ml] Ambroxol [10,0 µM] TDM	80,6	±	9,7*	71,8	±	32,0*	115,6	±	25,8*	101,0	±	7,1*
αLS[10,0 µg/ml] Ambroxol [100,0 µM] TDM	70,3	±	6,7*	74,6	±	30,1*	101,4	±	23,1*	62,4	±	15,9*
αLS[10,0 µg/ml] Ambroxol [1000,0 µM] TDM	10,5	±	7,3	40,7	±	24,5	22,5	±	5,2	20,5	±	21,5

5      Tabelle 2 zeigt den Einfluss von α-Liponsäure in Kombination mit Ambroxol auf die membranständige Thiolkonzentration einer Alveolarmakrophagen-Zelllinie [\* : p<0,05, ANOVA, n=12]. Tabelle 2 unterlegt die parallele Induktion von membranständigen Thiolen.

Tabelle 2:

Thiole, membranständig (CMTMR) [%]	24h		48h		72h		96h	
	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD
KO, normal RPMI1640	100,0	± 52,6	100,0	± 7,9	100,0	± 44,9	100,0	± 44,2
KO, thioldefizient TDM	75,9	± 38,2	86,1	± 15,0	68,2	± 3,3	82,7	± 44,1
αLS[10,0 µg/ml] TDM	91,1	± 66,3	165,5	± 36,3	82,3	± 42,1	118,9	± 76,6
αLS[10,0 µg/ml] Ambroxol [0,1 µM] TDM	90,7	± 55,7	176,3	± 6,1*	82,5	± 31,6	122,6	± 76,8*
αLS[10,0 µg/ml] Ambroxol [1,0 µM] TDM	96,2	± 55,4	161,1	± 25,3*	82,2	± 23,9*	144,9	± 110,4*
αLS[10,0 µg/ml] Ambroxol [10,0 µM] TDM	97,3	± 51,7	165,8	± 37,2*	87,2	± 31,0*	125,8	± 73,4*
αLS[10,0 µg/ml] Ambroxol [100,0 µM] TDM	106,6	± 61,2*	170,3	± 36,8*	93,5	± 28,9*	117,0	± 51,0*
αLS[10,0 µg/ml] Ambroxol [1000,0 µM] TDM	110,7	± 25,6	159,9	± 18,2*	95,1	± 27,5	125,0	± 15,7*

## 5 Beispiel 2

Einfluss von α-Liponsäure in Kombination mit Silibinin auf den zellulären Thiolstatus von Alveolarmakrophagen

10

Immortalisierte Alveolarmakrophagen wurden in der im Beispiel 1 beschriebenen Versuchsanordnung artifizuell thioldepletiert. Der Einfluss der erfindungsgemäß zur Anwendung kommenden Substanzen wurde über einen Zeitraum von 96 Stunden mittels Messung des intrazellulären Thiolgehaltes sowie der Membranexpression von Thiolen überprüft.

15

Es zeigte sich, dass beginnend nach 24 Stunden die Kombination von  $\alpha$ -Liponsäure und Silibinin einem engen Konzentrationsbereich um 70  $\mu\text{g/ml}$  eine vollständige Restitution des Thiolstatus der Alveolarmakrophagen initiierte. Wie in Tabelle 3 dargestellt, wurden signifikante Steigerungen des Thiolgehaltes über den gesamten Untersuchungszeitraum für diese Silibininindosis nachgewiesen. Die alleinige Wirkung der  $\alpha$ -Liponsäure wurde regelmäßig signifikant überschritten. Geringere additive Konzentrationen von Silibinin induzierten nach einer längeren Behandlungsdauer ebenfalls eine Thiolrestitution.

Die Beeinflussung membranständiger Thiole war, wie in Tabelle 4 belegt, in den oben genannten Konzentrations-Zeitregimen nachweisbar. Im Gegensatz zu der intrazellulären Induktion wurden Oberflächenthiole bereits nach 24 Stunden in Gegenwart geringerer Silibininkonzentrationen moduliert.

Tabelle 3 zeigt den Einfluss von  $\alpha$ -Liponsäure in Kombination mit Silibinin auf die intrazelluläre Thiolkonzentration einer Alveolarmakrophagen-Zelllinie [\* :  $p < 0,05$ , ANOVA,  $n=12$ ].

Tabelle 3:

Thiole, intrazellulär (CMFDA) [%]	24h		48h		72h		96h	
	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD
KO, normal RPMI1640	100,0	± 29,0	100,0	± 29,3	100,0	± 52,4	100,0	± 14,2
KO, thioldefizient TDM	77,4	± 26,6	86,8	± 4,0	88,8	± 50,0	82,1	± 13,7
αLS[10,0 µg/ml] TDM	69,2	± 28,2	91,1	± 16,6	88,6	± 26,2	114,8	± 33,2
αLS[10,0 µg/ml] Silibinin [0,07 µg/ml] TDM	77,5	± 26,8*	91,5	± 17,3	92,9	± 45,0	122,6	± 33,1*
αLS[10,0 µg/ml] Silibinin [0,7 µg/ml] TDM	75,1	± 27,4	93,1	± 24,7	90,0	± 37,8	108,2	± 22,9*
αLS[10,0 µg/ml] Silibinin [7,0 µg/ml] TDM	73,3	± 2,3	90,4	± 29,0	85,9	± 35,7	124,2	± 40,1*
αLS[10,0 µg/ml] Silibinin [70,0 µg/ml] TDM	161,7	± 76,7*	173,4	± 85,2*	126,6	± 29,5*	143,3	± 51,9*
αLS[10,0 µg/ml] Silibinin [700,0 µg/ml] TDM	40,9	± 17,4	18,7	± 10,5	17,1	± 11,6	22,5	± 7,5

5

Tabelle 4 zeigt den Einfluss von α-Liponsäure in Kombination mit Silibinin auf die membranständige Thiolkonzentration einer Alveolarmakrophagen-Zelllinie  
[\*: p<0,05, ANOVA, n=12].

10

Tabelle 4:

Thiole, membran- ständig (CMFDA) [%]	24h MW      ± SD	48h MW      ± SD	72h MW      ± SD	96h MW      ± SD
KO, normal RPMI1640	100,0 ± 6,8	100,0 ± 8,2	100,0 ± 34,5	100,0 ± 47,0
KO, thioldefizient TDM	82,5 ± 3,6	88,9 ± 7,3	87,5 ± 35,7	100,2 ± 54,5
αLS[10,0 µg/ml] TDM	108,8 ± 38,2	126,2 ± 68,6	90,7 ± 28,1	107,3 ± 57,4
αLS[10,0 µg/ml] Silibinin [0,07 µg/ml] TDM	103,4 ± 54,6	126,7 ± 56,8	106,3 ± 39,5	109,9 ± 60,9
αLS[10,0 µg/ml] Silibinin [0,7 µg/ml] TDM	124,3 ± 21,7*	133,8 ± 54,2*	91,8 ± 36,6	110,9 ± 45,9
αLS[10,0 µg/ml] Silibinin [7,0 µg/ml] TDM	109,4 ± 32,9*	175,2 ± 65,8*	135,7 ± 21,0*	111,2 ± 30,4
αLS[10,0 µg/ml] Silibinin [70,0 µg/ml] TDM	150,0 ± 24,1*	138,7 ± 62,4*	102,0 ± 45,0*	110,5 ± 44,2
αLS[10,0 µg/ml] Silibinin [700,0 µg/ml] TDM	68,3 ± 4,0	103,1 ± 26,1	91,1 ± 32,9	122,1 ± 39,2

## 5      Beispiel 3

Einfluss der Kombination von α-Liponsäure in Kombination mit Ambroxol auf den zellulären Thiolstatus von primären Alveolarmakrophagen von COPD Patienten

10

Alveolarmakrophagen wurden aus der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von COPD Patienten isoliert, in Zellkulturmedium aufgenommen und in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, einer relativen Luftfeuchte von 98% und 7,5% relativem Luft-CO<sub>2</sub>-Gehalt inkubiert. Um den Einfluss der erfindungsgemäß zur Anwendung kommenden Kombinationen auf den Thiolstatus der Peritonealmakrophagen zu prüfen, wurden jeweils eine Frak-

15

tion mit  $\alpha$ -Liponsäure, dem Effektor des Glutathionmetabolismus Ambroxol bzw. mit der Kombination von  $\alpha$ -Liponsäure / Ambroxol behandelt, während jeweils eine weitere Fraktion als unbehandelte Kontrolle geführt wurde. Unbehandelte Alveolarmakrophagen von gesunden, nicht-COPD Patienten dienten als Normalvergleich

Die Bestimmung des zellulären Thiolstatus erfolgte mittels der unter 1. beschriebenen Meßmethode. In der Tabelle 5 ist der Effekt der Kombination von  $\alpha$ -Liponsäure und Ambroxol in der Zeitkinetik über 96 Stunden in Relation zu Gesunden dargestellt.

Unter Zusatz der Monosubstanzen war nur ein marginaler Anstieg der zellulären Thiolexpression unter Verwendung von Ambroxol zu beobachten, während  $\alpha$ -Liponsäure keinen Effekt zeigte. Demgegenüber war unter der Kombination von  $\alpha$ -Liponsäure und Ambroxol beginnend nach 24 Stunden ein deutlicher Anstieg der zellulären Thiolexpression nachweisbar, der in Gegenwart von 10  $\mu$ M Ambroxol ein superadditives und signifikantes Maximum im gesamten Untersuchungszeitraum erreichte.

Tabelle 5 zeigt den Einfluss von  $\alpha$ -Liponsäure in Kombination mit Ambroxol auf die zelluläre Thiolkonzentration primärer Alveolarmakrophagen von COPD-Patienten [\* :  $p < 0,05$ , ANOVA,  $n=8$ ].



Tabelle 5:

Thiole, intrazellulär (CMFDA) [%]	24h			48h			72h			96h		
	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD
Kontrolle normal RPMI1640	100,0	±	19,7	100,0	±	13,1	100,0	±	31,8	100,0	±	23,2
Kontrolle, COPD, RPMI1640	61,6	±	13,9	58,6	±	13,7	46,1	±	18,8	51,9	±	14,3
αLS[10,0 µg/ml] RPMI1640	60,3	±	21,0	58,0	±	17,0	46,2	±	19,8	62,4	±	6,3
Ambroxol [10,0 µ/ml] RPMI1640	67,4	±	16,4	61,8	±	11,5	61,6	±	20,8	67,1	±	8,4
αLS[10,0 µg/ml] Ambroxol [1,0 µM] RPMI1640	81,1	±	15,7*	81,9	±	10,1*	83,9	±	18,2*	81,2	±	8,8*
αLS[10,0 µg/ml] Ambroxol [10,0 µM] RPMI1640	101,2	±	17,7*	109,5	±	13,4*	113,9	±	25,6*	107,8	±	26,8*
αLS[10,0 µg/ml] Ambroxol [100,0 µM] RPMI1640	84,7	±	25,5	79,6	±	13,4	70,0	±	31,8*	76,6	±	9,7
αLS[10,0 µg/ml] Ambroxol [1000,0 µM] RPMI1640	31,5	±	12,1	53,8	±	22,8	34,8	±	2,1	36,1	±	4,2

## 5 Beispiel 4

Einfluss der Kombination von α-Liponsäure in Kombination mit Silibinin auf den zellulären Thiolstatus von primären Alveolarmakrophagen von COPD Patienten

10

In einer, dem Beispiel 3 identischen Versuchsanordnung wurden Alveolarmakrophagen von COPD Patienten jeweils mit α-Liponsäure, dem Effektor Silibinin bzw. mit der Kombination von α-Liponsäure / Silibinin behandelt, während wiederum jeweils eine weitere Fraktion als unbehandelte Kontrolle geführt wurde. Unbehandelte Alveolarmakrophagen von gesunden, nicht-COPD Patienten dienten auch hier als Normalvergleich.

15

Die Bestimmung des zellulären Thiolstatus erfolgte mittels der unter 1. beschriebenen Meßmethode. In der Tabelle 6 ist der Effekt der Kombination von  $\alpha$ -Liponsäure und Silibinin in der Zeitkinetik über 96 Stunden in Relation zu Gesunden dargestellt.

Unter Zusatz der Monosubstanzen  $\alpha$ -Liponsäure oder Silibinin war keine Modulation der zellulären Thiol-expression zu beobachten. Demgegenüber war unter der Kombination von  $\alpha$ -Liponsäure und Silibinin beginnend nach 24 Stunden ein deutlicher Anstieg der zellulären Thiolexpression nachweisbar, der in Gegenwart von 70  $\mu\text{g/ml}$  Silibinin ein superadditives und signifikantes Maximum im gesamten Untersuchungszeitraum erreichte.

Tabelle 6 zeigt den Einfluss von  $\alpha$ -Liponsäure in Kombination mit Silibinin auf die zelluläre Thiolkonzentration primärer Alveolarmakrophagen von COPD-Patienten [\* :  $p < 0,05$ , ANOVA,  $n=8$ ].

Tabelle 6:

Thiole, intrazellulär (CMFDA) [%]	24h MW      ± SD	48h MW      ± SD	72h MW      ± SD	96h MW      ± SD
Kontrolle, normal RPMI1640	100,0 ± 19,7	100,0 ± 8,2	100,0 ± 31,8	100,0 ± 23,2
Kontrolle, COPD, RPMI1640	61,6 ± 13,9	58,6 ± 7,3	46,1 ± 18,8	51,9 ± 14,3
αLS [10,0 µg/ml] RPMI1640	60,3 ± 21,0	58,0 ± 68,6	46,2 ± 19,8	62,4 ± 6,3
Silibinin [70 µg/ml] RPMI1640	56,1 ± 12,4	59,0 ± 56,8	44,7 ± 14,0	49,4 ± 14,5
αLS[10,0 µg/ml] Silibinin [0,7 µg/ml] RPMI1640	64,1 ± 10,2*	64,7 ± 54,2*	49,9 ± 11,8	62,6 ± 8,0
αLS[10,0 µg/ml] Silibinin [7,0 µg/ml] RPMI1640	84,5 ± 14,1*	76,0 ± 65,8*	78,6 ± 14,9*	81,8 ± 17,8
αLS[10,0 µg/ml] Silibinin [70,0 µg/ml] RPMI1640	102,5 ± 22,6*	103,3 ± 62,4*	100,0 ± 27,1*	92,7 ± 20,1*
αLS[10,0 µg/ml] Silibinin [700,0 µg/ml] RPMI1640	59,4 ± 11,7	36,2 ± 26,1	38,8 ± 10,3	35,7 ± 2,7

## 5      Beispiel 5

Einfluss auf die Phagozytosefähigkeit von Alveolarmakrophagen

10      Um eine Charakterisierung der Alveolarmakrophagen hinsichtlich ihrer originären Funktionen zu ermöglichen, wurde die Phagozytosefähigkeit als Messgröße ausgewählt.

15      Alveolarmakrophagen wurden analog des im Beispiel 3 beschriebenen Vorgehens isoliert und ex vivo kultiviert. Die Bestimmung der Phagozytoseleistung erfolgte durch einen zytofluorimetrischen Test auf Einzel-

zellebene. Dabei wurden die Makrophagen mit opsonierten und fluorochrommarkierten Bakterien kokultiviert. Die Menge der in einem definierten Zeitraum aufgenommenen Bakterien wurde quantitativ über die Fluoreszenzintensität in den Makrophagen erfasst und galt als Maß für deren Phagozytosekapazität. Der Einfluss der erfindungsgemäß zur Anwendung kommenden Kombinationen auf die Phagozytosefähigkeit der Peritonealmakrophagen nach einer Behandlungsdauer von bis zu 96 Stunden ist in der Tabelle 7 dargestellt.

Nach Inkubation mit  $\alpha$ -Liponsäure, Ambroxol bzw. Silibinin war die Phagozytoserate gegenüber der unbehandelten Kontrolle nicht verändert. Demgegenüber konnte unter Verwendung der Kombination von  $\alpha$ -Liponsäure und Ambroxol eine signifikante Steigerung der Phagozytoserate erreicht werden, die nach 72 Stunden den Werten der gesunden Kontrollgruppe entsprach.

Ähnlich war der Verlauf der Phagozytoseinduktion unter der Kombination von  $\alpha$ -Liponsäure und Silibinin in einer Konzentration von 70  $\mu\text{g/ml}$ . Auch hier wurde eine signifikante Verbesserung der Phagozytosekapazität parallel zu einer Restitutation des Thiolstatus nachgewiesen.

Tabelle 7 zeigt den Einfluss von  $\alpha$ -Liponsäure in Kombination mit Ambroxol bzw. Silibinin auf die Phagozytoserate primärer Alveolarmakrophagen von COPD-Patienten [\* :  $p < 0,05$ , ANOVA,  $n=6$ ].

Tabelle 7:

Phagoburst (mfi) [%]	24h MW      ± SD	48h MW      ± SD	72h MW      ± SD	96h MW      ± SD
Kontrolle, normal RPMI1640	100,0 ± 16,8	100,0 ± 22,2	100,0 ± 14,6	100,0 ± 13,7
Kontrolle, COPD, RPMI1640	56,9 ± 15,5	55,4 ± 14,1	57,0 ± 9,7	67,7 ± 13,7
αLS [10,0 µg/ml] RPMI1640	59,0 ± 11,7	60,2 ± 12,4	50,7 ± 9,0	64,9 ± 14,3
Ambroxol [10 µM] RPMI1640	53,3 ± 10,9	59,2 ± 12,4	55,2 ± 19,2	61,9 ± 22,1
Silibinin [70,0 µg/ml] RPMI1640	55,1 ± 12,2*	57,6 ± 8,5	54,2 ± 13,8	59,9 ± 21,2
αLS [10,0 µg/ml] Ambroxol [10 µM] RPMI1640	81,5 ± 19,0*	93,2 ± 18,4*	116,4 ± 17,6*	102,8 ± 4,8*
αLS [10,0 µg/ml] Silibinin [70,0 µg/ml] RPMI1640	75,5 ± 17,3*	86,5 ± 16,7*	98,7 ± 22,6*	92,5 ± 9,1*

Insgesamt machen diese Versuche deutlich, dass die Applikation der Kombination von α-Liponsäure und den Effektoren des Glutathionmetabolismus Ambroxol bzw. Silibinin einen primär massiv geschädigten Thiolstatus in thioldefizienten Alveolarmakrophagen sowohl nach artifizieller Thioldefizienz als auch bei COPD-Patienten stabilisiert. Durch diese Normalisierung kommt es darüberhinaus zu einer Wiederherstellung zentraler zellulärer Funktionen, wie der Phagozytoseaktivität, welche ohne eine solche Behandlung nicht zu verzeichnen ist.

## Patentansprüche

5

1. Verwendung von mindestens einem Effektor des Glutathionmetabolismus zusammen mit  $\alpha$ -Liponsäure, deren Salze und/oder deren Prodrugs zur gleichzeitigen, getrennten oder zeitlich abgestuften zytoprotektiven Behandlung chronisch obstruktiver Lungenerkrankungen.

10

2. Verwendung nach Anspruch 1,

15

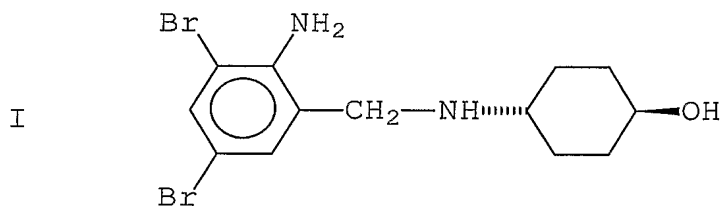
dadurch gekennzeichnet, dass die Dosis der  $\alpha$ -Liponsäure, deren Salze und/oder deren Prodrugs für die humanmedizinische Applikation beim Patienten zwischen 30 und 1800 mg/d, bevorzugt zwischen 200 und 600 mg/d liegt.

20

3. Verwendung nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche,

25

dadurch gekennzeichnet, dass als Effektor Ambroxol mit der allgemeinen Formel I,



30

dessen Salze und/oder dessen Prodrugs verwendet wird.

4. Verwendung nach Anspruch 3,

dadurch gekennzeichnet, dass die Dosis von Ambroxol, dessen Salze und/oder dessen Prodrugs für die humanmedizinische Applikation beim Patienten zwischen 7,5 und 90 mg/d, bevorzugt zwischen 60 und 75 mg/d liegt.

5. Verwendung nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, dass als Effektor Silibinin, dessen Salze und/oder dessen Prodrugs verwendet wird.

6. Verwendung nach Anspruch 5,

dadurch gekennzeichnet, dass die Dosis von Silibinin, dessen Salze und/oder dessen Prodrugs für die humanmedizinische Applikation beim Patienten zwischen 20 und 1600 mg/d, bevorzugt zwischen 300 und 800 mg/d liegt.

7. Verwendung nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, dass das Arzneimittel inhalativ, oral oder parenteral verabreichbar ist.

8. Verwendung nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, dass das Arzneimittel weitere Additive ausgewählt der Gruppe wässriger Lösungsmittel, Stabilisatoren, Suspensions-, Dispersions- und Benetzungsmittel enthält.

9. Verwendung nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, dass das Arzneimittel in Form eines Aerosols, einer Lösung, eines Granulats, eines Pulver, einer Emulsion, einer Tablette und/oder einer Filmtablette vorliegt.

10. Verwendung nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, dass der Effektor des Glutathionmetabolismus und die  $\alpha$ -Liponsäure, deren Salze und/oder deren Prodrugs in einer einzigen Formulierung vorliegen.

11. Verwendung nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, dass der Effektor des Glutathionmetabolismus und die  $\alpha$ -Liponsäure, deren Salze und/oder deren Prodrugs in getrennten Formulierungen vorliegen.